

MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19) 【発行国】 日本国特許庁 (J P)	(19)[ISSUING COUNTRY] Japan Patent Office (JP)
(12) 【公報種別】 公開特許公報 (A)	(12)[GAZETTE CATEGORY] Laid-open Kokai Patent (A)
(11) 【公開番号】 特開平 7 - 2 0 3 9 8 4	(11)[KOKAI NUMBER] Unexamined Japanese Patent Heisei 7-203984
(43) 【公開日】 平成 7 年 (1 9 9 5) 8 月 8 日	(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION] August 8, Heisei 7 (1995. 8.8)
(54) 【発明の名称】 蛋白質の合成方法	(54)[TITLE of the Invention] A proteinic synthesis method
(51) 【国際特許分類第 6 版】 C12P 21/00 9282-4B	(51)[IPC Int. Cl. 6] A C12P 21/00 A 9282-4B
【審査請求】 未請求	[REQUEST FOR EXAMINATION] No
【請求項の数】 9	[NUMBER OF CLAIMS] 9
【出願形態】 O L	[FORM of APPLICATION] Electronic
【全頁数】 6	[NUMBER OF PAGES] 6
(21) 【出願番号】 特願平 6 - 7 1 3 1	(21)[APPLICATION NUMBER] Japanese Patent Application Heisei 6-7131
(22) 【出願日】 平成 6 年 (1 9 9 4) 1 月 2 6	(22)[DATE OF FILING] January 26, Heisei 6 (1994. 1.26)

日

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

[ID CODE]

5 9 4 0 1 6 1 8 2

594016182

【氏名又は名称】

[NAME OR APPELLATION]

遠藤 弥重太

Yaeta Endo

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

愛媛県松山市朝美 1 丁目 5 番 3
号

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

[ID CODE]

0 0 0 0 0 0 0 4 4

000000044

【氏名又は名称】

[NAME OR APPELLATION]

旭硝子株式会社

Asahi Glass Co., Ltd.

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

東京都千代田区丸の内 2 丁目 1
番 2 号

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 遠藤 弥重太

[NAME OR APPELLATION] Yaeta Endo

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

愛媛県松山市石手 4 丁目 3 番 4
2 号

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】
吉成 茂夫

[NAME OR APPELLATION]
Shigeo Yoshinari

【住所又は居所】
愛媛県松山市桑原 2 丁目 9 番 8
号

[ADDRESS or DOMICILE]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】
大場 優孝

[NAME OR APPELLATION]
Masataka Oba

【住所又は居所】
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町
1 1 5 0 番地 旭硝子株式会社
中央研究所内

[ADDRESS or DOMICILE]

(74) 【代理人】

(74)[AGENT]

【弁理士】

[PATENT ATTORNEY]

【氏名又は名称】
泉名 謙治

[NAME OR APPELLATION]
Kenji Sensho

(57) 【要約】

(57)[ABSTRACT of the Disclosure]

【目的】
蛋白質合成量を高めた無細胞蛋白質合成系による蛋白質合成方法を提供する。

[PURPOSE]
A protein synthesis method by a non-cellular-proteins constructional system which increases the protein-synthesis amount is provided.

【構成】
細胞破壊に伴って誘発される活

[CONSTITUTION]
The active inhibitor accompanied and induced

性阻害因子であって、かつ核酸合成および／または蛋白質合成の活性を阻害する因子である活性阻害因子の活性化を抑制し、細胞を含まない蛋白質合成系で遺伝子情報より蛋白質を合成する。

by the cytoclasis and activation of the active inhibitor which is a factor which obstructs the activity of a nucleic-acid synthesis and/or a protein synthesis is suppressed, and a protein is compounded from gene information by the protein constructional system which does not contain a cell.

【特許請求の範囲】**[CLAIMS]****【請求項 1】**

細胞破壊に伴って誘発される活性阻害因子であって、核酸合成および／または蛋白質合成の活性を阻害する因子である活性阻害因子の活性化を抑制した無細胞蛋白質合成系で遺伝子情報より蛋白質を合成することを特徴とする、蛋白質の合成方法。

[CLAIM 1]

A proteinic synthesis method comprising an active inhibitor accompanied and induced by cytoclasis wherein a protein is compounded from gene information by the non-cellular-proteins constructional system which suppressed activation of the active inhibitor which is a factor which obstructs the activity of a nucleic-acid synthesis and/or a protein synthesis.

【請求項 2】

細胞を含まない蛋白質合成系が細胞を破壊して得られる蛋白質合成系である、請求項 1 の合成方法。

[CLAIM 2]

The synthesis method of Claim 1 which is a protein constructional system obtained by the protein constructional system which does not contain a cell fracturing a cell.

【請求項 3】

細胞が、動物細胞、植物細胞、真菌細胞、または細菌細胞である、請求項 2 の合成方法。

[CLAIM 3]

The synthesis method of Claim 2 whose cell is an animal cell, a plant cell, a fungi cell, or a bacteria cell.

【請求項 4】

活性阻害因子がポリペプチドないし蛋白質である、請求項 1 の合成方法。

[CLAIM 4]

The synthesis method of Claim 1 whose active inhibitor is polypeptide or a protein.

【請求項 5】

活性阻害因子が核酸である、請求項 1 の合成方法。

[CLAIM 5]

The synthesis method of Claim 1 whose active inhibitor is a nucleic acid.

【請求項 6】

活性阻害因子の活性化抑制が、活性阻害因子の阻害剤の使用によるものである、請求項 1 の合成方法。

[CLAIM 6]

The synthesis method of Claim 1 wherein the activation inhibition of the active inhibitor is based on use of the inhibitor of the active inhibitor.

【請求項 7】

阻害剤が活性阻害因子を中和する抗体である、請求項 6 の合成方法。

[CLAIM 7]

The synthesis method of Claim 6 which is the antibody in which an inhibitor neutralizes the active inhibitor.

【請求項 8】

活性阻害因子の活性化抑制が、活性阻害因子の除去によるものである、請求項 1 の合成方法。

[CLAIM 8]

The synthesis method of Claim 1 wherein the activation inhibition of the active inhibitor is based on elimination of the active inhibitor.

【請求項 9】

細胞破壊によって得られ、破壊された細胞が有していた蛋白質合成能を利用する蛋白質合成用の組成物において、細胞破壊に伴って誘発される活性阻害因子であって、核酸合成および／または蛋白質合成の活性を阻害する因子である活性阻害因子を蛋白質合成用組成物から除去してなるか蛋白質合成用組成物中でのその活性化を抑制してなる、細胞を含まない蛋白質合成用組成物。

[CLAIM 9]

In the composition using the protein-synthesis ability which was obtained by the cytoclasis and the fractured cell had for protein synthesis, it is the active inhibitor accompanied and induced by the cytoclasis, comprised such that the composition for protein synthesis which removes the active inhibitor which is a factor which obstructs the activity of a nucleic-acid synthesis and/or a protein synthesis from the composition for protein synthesis, or suppresses the activation in the composition for protein synthesis and which does not contain a cell.

【発明の詳細な説明】**[DETAILED DESCRIPTION of the INVENTION]****【 0 0 0 1 】****[0001]****【産業上の利用分野】**

本発明は、核酸（DNAあるいはRNA）を鋳型とする、遺伝子情報から細胞を含まない蛋白質合成系で蛋白質を合成する方法に関するものである。

[INDUSTRIAL APPLICATION]

This invention relates to the method of compounding a protein by the protein constructional system which uses a nucleic acid (DNA or RNA) as a casting mould and which does not contain a cell from gene information.

【 0 0 0 2 】**[0002]****【従来の技術】**

ニレンバーグ（Nirenberg）らによって開発された、大腸菌抽出液を利用する無細胞蛋白質合成系（Nirenberg, M.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 47, 1588-1602 (1961)）は、蛋白質合成機構の解明に大きな役割を果たした。その後、翻訳効率の高い無細胞蛋白質合成系が、大腸菌の他にも、コムギ胚芽やウサギ網状赤血球等からも調製され、現在では遺伝子翻訳産物の同定などに、広く利用されるようになった（Wu, R., et al., (ed) Methods in Enzymology, vol. 101, P.598, P.616, P.629, P.635, P.644, P.650, P.674, P.690, Academic Press, New York (1983)）。

[PRIOR ART]

The non-cellular-proteins constructional system (Nirenberg, M.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 47, 1588-1602 (1961)) using an Escherichia-coli extract developed by Nirenberg (Nirenberg) and others played the major role in the breakthrough of a protein-synthesis mechanism.

After that, the high non-cellular-proteins constructional system of a translation rate is prepared from a wheat embryo, a rabbit reticulocyte, etc. besides an Escherichia coli, now, it came to utilize for the identification of a gene translation production etc. widely.

(Wu, R., et al., (ed) Methods in Enzymology, vol. 101, P.598, P.616, P.629, P.635, P.644, P.650, P.674, P.690, Academic Press, and New York (1983)).

【0003】

[0003]

【発明が解決しようとする課題】

しかし、上記の無細胞蛋白質合成系における蛋白質合成量は、生細胞に比べると百分の一から一万分の一と極端に低いことから、蛋白質の調製法としては利用できないという欠点がある。

[PROBLEM to be solved by the Invention]

However, since the protein-synthesis amount in the above-mentioned non-cellular-proteins constructional system is extremely as low as 1/100 to 1/10,000 compared with a living cell, it has the fault that it cannot utilize as a proteinic preparation method.

【0004】

[0004]

最近、旧ソ連のスピリン(Spirin)らは、無細胞蛋白質合成系の効率化を目指して、連続式無細胞蛋白質合成システム(Continuous Flow Cell-Free Translation System)を開発した(Spirin, A.S., et al., Science, 242, 1162-1164 (1988))。このシステムが従来の無細胞蛋白質合成系と異なる点は、合成反応で消費されるアミノ酸やエネルギー源などの基質を反応槽へ連続的に供給する一方、翻訳産物は系から取り出すというものである。しかし彼らのシステムも、蛋白質合成反応系としては、コムギ胚芽、ウサギ網状赤血球、あるいは大腸菌等から従来通りの方法で調製した翻訳活性の低い細胞抽出液を利用するものであることから、大幅な蛋白質合成効率の改良は望めない。

Recently, Spirin (Spirin) and others of the former Soviet Union aims at the increase in efficiency of a non-cellular-proteins constructional system, the continuous system non-cellular-proteins synthesis system (Continuous Flow Cell-Free Translation System) was developed (Spirin, A.S., et al., Science, 242, 1162-1164 (1988)).

While the point of view that this system differs from the conventional non-cellular-proteins constructional system supplies continuously substrates consumed at a synthetic reaction, such as an amino acid and an energy source, to a reaction vessel, a translation production is taken out from a group.

However, their systems are also a wheat embryo and a rabbit reticulocyte as a protein-synthesis reaction system, or improvement of large protein-synthesis efficiency cannot be expected from it being one using a cell extract with the low translation activity prepared by the method as usual from the Escherichia coli etc.

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、従来の技術では注目されておらず不可避であった細胞破壊に伴って活性化される、核酸合成および／または蛋白質合成の活性阻害因子の活性化を抑制することにより、従来より効率の良い無細胞蛋白質合成系を調製することができることを見い出した。本発明はこの知見に基づく下記の発明であり、またその蛋白質合成系（蛋白質合成用組成物）の発明である。

【 0 0 0 6 】

細胞破壊に伴って誘発される、核酸合成および／または蛋白質合成の活性阻害因子の活性化を抑制した細胞を含まない蛋白質合成系で遺伝子情報より蛋白質を合成することを特徴とする、蛋白質の合成方法。

【 0 0 0 7 】

本発明における核酸合成および／または蛋白質合成の活性阻害因子とは、細胞破壊に伴って誘発される因子であり、その因子は通常ポリペプチドないし蛋白質からなる酵素であり、また核酸の場合もある。この活性阻害因子は細胞破壊に伴うプログラ

[0005]

[MEANS to solve the Problem]

This inventor found out that a conventionally efficient non-cellular-proteins constructional system could be prepared in the PRIOR ART by suppressing activation of the active inhibitor of the nucleic-acid synthesis which it is not observed, but is accompanied and activated by the unescapable cytoclasis, and/or a protein synthesis.

This invention is the following invention based on these findings.

Moreover, it is invention of the protein constructional system (composition for protein synthesis).

[0006]

A protein is compounded from gene information by the protein constructional system which does not contain the cell which suppressed activation of the active inhibitor of the nucleic-acid synthesis induced by the cytoclasis by accompanying, and/or a protein synthesis.

The proteinic synthesis method characterized by the above-mentioned.

[0007]

The active inhibitor of the nucleic-acid synthesis in this invention and/or a protein synthesis is a factor accompanied and induced by the cytoclasis.

The factor is an enzyme which is usually made of polypeptide or a protein.

Moreover, there may be a nucleic acid.

This active inhibitor is induced by the action of

ム細胞死機構の作動によって誘発されものであり、元々生物が個体あるいは集団の生存を可能にするために個々の細胞が持っている因子であると考えられる。この因子が活性化されると、例えば転写活性や翻訳活性などが阻害されることにより核酸合成および／または蛋白質合成の活性化が阻害されると考えられる。

【0008】

この活性阻害因子は、通常種々のポリペプチドないし蛋白質からなる酵素であり、具体的な例としては、リボソーム活性を阻害するリボソーム不活性化蛋白質、リボヌクレアーゼ、リボヌクレオチドホスホリラーゼなどが挙げられる。上記活性阻害因子の活性化を抑制する手段としては、それを蛋白質合成系から除去することは勿論、蛋白質合成系内でその活性化を阻害する手段を採用することができる。特に、蛋白質合成系からこの活性阻害因子を選択的に除去することが困難な場合が少なくないことより、その活性化を阻害する手段、特に特異的阻害剤を使用する手段、を採用することが好ましい。

【0009】

上記活性阻害因子の特異的阻害

the programmed-cell-death mechanism accompanied to the cytolysis.

In order that an organism may enable survival of a solid or a population from the first, it is thought that it is the factor which each cell has.

If this factor is activated, it will be thought by obstructing a transcriptional activity, translation active property, etc., for example that it obstructs activation of a nucleic-acid synthesis and/or a protein synthesis.

[0008]

This active inhibitor is an enzyme which is usually made of various polypeptide or various protein.

As a concrete example, the ribosome inactivation protein which obstructs a ribosome activity, a RNase, ribonucleotide phosphorylase, etc. are mentioned.

As means to suppress activation of the above-mentioned active inhibitor, means to obstruct the activation within a protein constructional system are employable as well as removing it from a protein constructional system.

Means by which the case where it is difficult to remove this active inhibitor from a protein constructional system selectively in particular obstructs that activation from it not being little, means to use in particular a specific inhibitor, adopting is preferable.

[0009]

The antibody which bonds with this active

剤としては、この活性阻害因子に特異的に結合しその活性を抑制する抗体が好ましい。この中和抗体は活性阻害因子の酵素活性を中和することにより、活性阻害因子の活性化を阻害すると考えられる。抗体としては、ポリクローナル抗体は勿論、モノクローナル抗体であってもよい。上記活性阻害因子の特異的阻害剤としてはこれら抗体に限られず、抗生物質などの種々の薬剤（蛋白質阻害剤、核酸系阻害剤など）であってもよい。これら阻害剤は抗体を含め2種以上併用することができる。

【0010】

抗体などの上記活性阻害因子に特異的に結合し得る物質はまた蛋白質合成系からこの活性阻害因子を選択的に除去する方法に使用することもできる。例えば、特異的に結合し得る物質を適当な高分子物質に固定化し、この固定化担体共存下に蛋白質合成系を接触させて活性阻害因子を蛋白質合成系から除去することができる。

【0011】

本発明における蛋白質合成系は実質的に生きた細胞を含まない

inhibitor specifically as a specific inhibitor of the above-mentioned active inhibitor, and suppresses that activity is preferable.

It is thought that this neutralizing antibody obstructs activation of the active inhibitor by neutralizing the enzyme activity of the active inhibitor.

As an antibody, a monoclonal antibody is sufficient as well as a polyclonal antibody.

As a specific inhibitor of the above-mentioned active inhibitor, it may not be restricted to these antibodies, but various chemicals (a protein inhibitor, nucleic-acid group inhibitor, etc.), such as antibiotics, may be used.

The 2 or more types combined use of these inhibitors can be carried out including an antibody.

[0010]

The substance which can be specifically bonded with the above-mentioned active inhibitor, such as an antibody, can also be used for the method of also removing this active inhibitor from a protein constructional system selectively.

For example, the substance which can be bonded specifically is immobilized in a suitable polymeric material, a protein constructional system can be made to be able to contact under this immobilization support coexistence, and the active inhibitor can be removed from a protein constructional system to it.

[0011]

The protein constructional system in this invention is the so-called non-cellular-proteins

いわゆる無細胞蛋白質合成系である。この蛋白質合成系は細胞破壊によって得られ、破壊された細胞が有していた蛋白質合成能を利用するものである。蛋白質合成系は細胞破壊液そのものであってもよいが、粗大固形分を除くなどの調製を行ったものが好ましい。通常は不要成分を除いた細胞抽出液に必要により成分を追加して調製される。

【0012】

無細胞蛋白質合成系を調製するための起源の細胞（破壊する細胞）は特に限定されず、有核生物、原核生物のいずれの細胞も使用できる。すなわち、動物細胞、植物細胞、真菌細胞、細菌細胞などが使用できる。具体的には、例えば、哺乳動物細胞、昆虫細胞、高等植物細胞、酵母細胞、放線菌細胞、大腸菌細胞などがある。

【0013】

本発明の無細胞蛋白質合成系による蛋白質の合成は、前記活性阻害因子の不活性化～除去した無細胞蛋白質合成系である点を除き従来と同様の方法で行うことができる。この方法は周知～公知のバッチ法であってもよく、前記したスピリンらの連続式無細胞蛋白質合成システムな

constructional system which does not contain the substantially useful cell.

This protein constructional system is acquired by the cytoclasis, the protein-synthesis ability which the fractured cell had is utilized.

The cytoclasis liquid itself is sufficient as a protein constructional system.

However, what was prepared except for the big and rough solid content etc. is preferable.

Usually, a component is added to the cell extract except a unnecessary component if necessary, and it is prepared.

[0012]

The cell (cell to fracture) in particular of the origin for preparing a non-cellular-proteins constructional system is not limited, but can use any cell of a nucleated organism and a prokaryote.

That is, an animal cell, a plant cell, a fungi cell, a bacteria cell, etc. can be used.

Specifically, there are a mammalian cell, an insect cell, a higher plant cell, a yeast cell, an Actinomyces cell, an Escherichia-coli cell, etc.

[0013]

A synthesis of the protein by the non-cellular-proteins constructional system of this invention can be performed by the method similar to the past except for the point of view of said active inhibitor which is the non-cellular-proteins constructional system carried out as for inactivation-elimination.

The batch method of common knowledge-public knowledge is sufficient as this

どの連続法であってもよい。

method, and continuous processes, such as the above-mentioned continuous system non-cellular-proteins synthesis system of Spirins, are sufficient as it.

【0014】

本発明について、コムギ胚芽の系を用いて行った実験により、具体例をもってさらに説明する。

[0014]

By experiment conducted about this invention using the group of a wheat embryo, it has an example and further illustrates.

【0015】

発明者らは先に、ヒマ種子に存在する細胞毒素蛋白質であるライシン (ricin) の毒性機構を分子レベルで解明した (Endo, Y., et al., J. Biol. Chem. (1987), 262, 5908-5912, Endo, Y., et al., J. Biol. Chem. (1987), 262, 8128-8130)。すなわち、ライシン A鎖は、リボソーム大亜粒子を構成する大RNA分子 (高等生物では26-28SrRNA、大腸菌では23SrRNAにあたる) の進化的にその構造が保存された特定部位のN-グリコシド結合 (ネズミ肝臓の28rRNAでは5'末端から4324番目) の加水分解を触媒する特異な酵素で、RNA N-グリコシダーゼ (RNA N-glycosidase) と命名した。リボソームは、この酵素活性によってアデニン1分子を遊離し、その翻訳機能を完全に消失する

[0015]

Inventors clarified previously the toxic mechanism of ricin which is the cytotoxin protein which exists in a castor bean seed with the molecular level (Endo, Y., et al., J. Biol. Chem. (1987), 262, 5908-5912, Endo, Y., et al., J. Biol. Chem. (1987), 262, 8128-8130). That is, the ricin A chain, with a unique enzyme which catalyses hydrolysis of the N-glycosidic bond (from 5' terminal to the 4324th of 28rRNA of a rat liver) of the specific part where the structure of the large RNA molecule (26-28SrRNA is in a higher organism, and 23SrRNA is in an Escherichia coli) which comprises a ribosome large sub particle was preserved evolutionally, a ribosome extricates adenine 1 molecule by this enzyme activity, and the translation function is lost completely.

ことになる。

【0016】

その後、ライシンA鎖と同一な活性を持ったリボソーム不活性化蛋白質 (Ribosome-Inactivating-Protein、以下RIPと略す) が多数の植物から単離された (Soria,M.R., et al.,in Genetically Engineered Toxins (ed.by Frankel,A.E.),pp.193-212,Marcel Dekker,Inc.(1992))。また、これらRIPの多くは、抗ウイルス作用を有することから、植物の自己防御機構に関与しているものと考えられているが、その実体に関しては不明の点が多い。

[0016]

It isolated the ribosome inactivation protein (it abbreviates Ribosome-Inactivating-Protein and Following RIP) which, after that, had the same activity as the ricin A chain from many plants (Soria, M.R., et al., in Genetically Engineered Toxins (ed.by Frankel, A.E.), pp.193-212, Marcel Dekker, Inc. (1992)). Moreover, since many of these RIP have an anti-viral effect, they are considered to participate in the self-barrier system of a plant. However, there are many unknown points of view about the substance.

【0017】

約30年前にニレンバーグらが、大腸菌から無細胞蛋白質合成系を開発して以来、種々の生物から無細胞蛋白質合成系が調製されている (Miller,J.S., et al.,in Methods in Enzymology,part C,101,pp.650-674,Academic Press(1983))。なかでも、コムギ胚芽、ウサギ網状赤血球、または大腸菌などから調製された無細胞蛋白質合成系は比較的蛋白質合成活性が高く、現在ではそれらのキットも市販されている。しかしいずれの系において

[0017]

Since Nirenberg and others developed the non-cellular-proteins constructional system from the Escherichia coli about 30 years ago, the non-cellular-proteins constructional system has been prepared from the various organism (Miller, J.S., et al., in Methods in Enzymology, part C, 101, pp.650-674, and Academic Press (1983)). Among them, the non-cellular-proteins constructional system prepared from the wheat embryo, the rabbit reticulocyte, or the Escherichia coli has a comparatively high protein-synthesis activity, and those kits are also marketed now.

も、翻訳反応は1～2時間で停止し翻訳効率が極めて低いことから、蛋白質の実用的な調製手段としては利用できないという欠点を有する。

【0018】

一般的に無細胞蛋白質合成系における蛋白質の合成量は生細胞のそれに比べて百分の一から一万分の一と見積もられているが (Mancheter, K.L., in Mammalian Protein Metabolism, ed. by Munro, H.N., et al., IV, pp.229-298, Academic Press(1970)) その原因については不明であった。発明者はまず、コムギ胚芽無細胞系における蛋白質合成活性低下の機作について調べることから無細胞蛋白質合成系の高効率の方策を検討した。

【0019】

コムギ胚芽にはトリチン (tritin) と呼ばれるRIPが存在し、そのRNAN-グリコシダーゼ活性は、植物細胞リボソームをライシンA鎖と同一の機構でこれを不活性化することが知られている (Roberts, W.K., Biochemistry(1979), 18, 2615-2621)。発明者らはこれまでの研究結果から、コムギ胚芽無細胞系における低い翻訳活性は、この内因性トリチンによる自己リ

However, also in which group, by stopping in 1 to 2 hours, since the translation rate is very low, a translation reaction has the fault that it cannot utilize as proteinic practical manufacture means.

[0018]

Generally, although the synthetic amount of the protein in a non-cellular-proteins constructional system estimated it as 1/100 to 1/10,000 compared with it of a living cell (Mancheter, K.L., in Mammalian Protein Metabolism, ed. by Munro, H.N., et al., IV, pp.229-298, Academic Press (1970)), it was unknown about the cause. Since the inventor examined first about the mechanism of a protein-synthesis active decline in a wheat embryo cell free system, he worked on the measure of high-efficiency of a non-cellular-proteins constructional system.

[0019]

RIP called tritin (tritin) exists in a wheat embryo, as for the RNAN-glycosidase activity, inactivating this by the mechanism of the same as the ricin A chain is known in the plant-cell ribosome (Roberts, W.K., Biochemistry (1979), 18, 2615-2621). From research findings until now, inventors thought that the low translation activity in a wheat embryo cell free system would originate in inactivation of the self-ribosome by this endogenous tritin. Then, the non-cellular proteins of a wheat

ボソームの不活性化に起因するのではないかと考えた。そこで、コムギ胚芽の無細胞蛋白質を調製し、細胞破壊に伴うトリチンの活性化、コムギ胚芽リボソームの不活性化を調べたところ、コムギ胚芽リボソームの28S rRNAのN-グリコシダーゼ特異的作用部位の脱アデニンが観察され、さらにそのN-グリコシダーゼがトリチンであることを抗体を用いて同定した。

embryo are prepared, when the activation of a tritine accompanied to the cytolysis and inactivation of a wheat embryo ribosome are examined, de adenine of N-glycosidase specific effect part of 28SrRNA of a wheat embryo ribosome is observed, it identified using the antibody that the N-glycosidase was further tritin.

【0020】

次に、上記の条件でトリチン抗体を共存させてコムギ胚芽無細胞蛋白質合成系の蛋白質合成効率を調べた。mRNAとしてジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を用い、 ^{14}C -ロイシンの取り込みを測定したところ、抗体添加系では無添加系に比べ反応時間が少なくとも1.5倍以上も延び、取り込み量も2.5倍以上であった。

[0020]

Next, the tritin antibody was coexisted on condition of the above, and the protein-synthesis efficiency of a wheat embryo non-cellular-proteins constructional system was examined.

When the capture of a ^{14}C - leucine was measured using dyhydrofolic-acid reductase (DHFR) as mRNA, in the antibody addition group, reaction time was prolonged by at least 1.5 or more times compared with the additive-free group, and the uptake quantity was also 2.5 or more times in it.

【0021】

以上のことをまとめると、(1)コムギ胚芽に内存するプログラム細胞死機構に関わるトリチンが、コムギ胚芽の破碎に伴って不可避免的に細胞抽出液に混入し、自己のリボソームを不活性化すること、(2)無細胞系における蛋白質合成の低下はこのこ

[0021]

If the above thing is summarized, (1) Tritin in connection with the programmed-cell-death mechanism which consists in a wheat embryo among them

Accompanying crushing of a wheat embryo, it mixes in a cell extract unavoidably, and a self ribosome is inactivated, (2) A decline of the protein synthesis in a cell free system is

とに起因すること、(3) 抗トリチン抗体を用いるなど、トリチン活性を除去・中和することによって長時間にわたって蛋白質合成反応が持続するようになるので蛋白質合成活性の効率化ができることなどが示された。

originating in this, (3)

An anti- tritin antibody is used, and since a protein-synthesis reaction came to have continued over the long time by removing * neutralizing the tritin activity, it was shown that the increase in efficiency of a protein-synthesis activity is made etc.

【0022】

以上説明した実験について、以下実施例として具体的に説明する。しかし、本発明はこの実施例のみに限定されるものではない。

[0022]

The experiment illustrated above is specifically illustrated as an Example below.

However, this invention is not limited only to this Example.

【0023】

【実施例】

〔実施例1〕

コムギ胚芽の破碎によって誘発されるトリチンの活性化および、コムギ胚芽リボソームの不活性化

[0023]

[EXAMPLES]

[Example 1]

Activation of tritin induced by crushing of a wheat embryo, and inactivation of a wheat embryo ribosome

【0024】

市販のコムギ胚芽をエリクソン (Erickson) の方法で破碎し、細胞抽出液を得た後、無細胞蛋白質合成液を調製した (Erickson, A.H., et al., in Methods in Enzymology (1983), 96, 38-50)。ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) をコードする mRNA を鋳型として用い、上記エリクソンらの方法に従って 26℃ で蛋

[0024]

A commercial wheat embryo is crushed by the method of Ericsson (Erickson), after obtaining a cell extract, the non-cellular-proteins synthesis liquid was prepared (Erickson, A.H., et al., in Methods in Enzymology (1983), 96, 38-50).

According to the method of the above-mentioned Ericssons, the protein synthesis was reacted at 26 degrees C, using mRNA which codes dyhydrofolic-acid reductase (DHFR) as a casting mould.

The de adenine-ized reaction by the

白質合成反応を行った。コムギ胚芽リボソームの内因性RNA N-グリコシダーゼによる脱アデニン化反応は発明者らの方法によって調べた (Endo, Y., et al., J. Biol. Chem. (1987), 262, 5908-5912)。

endogenous RNA N-glycosidase of a wheat embryo ribosome was examined by inventors' method (Endo, Y., et al., J. Biol. Chem. (1987), 262, 5908-5912).

【0025】

反応2、4、6時間後の反応液からそれぞれRNAを抽出し、酸性下アニリン処理を行った後、ゲル電気泳動で、28 r RNAを分離すると、図1の矢印部に新たなRNA断片が生じていることが認められた (それぞれレーン3、4、5の矢印部)。RNA断片の生成は、保温開始前には見られない (レーン1)。このRNA断片は、別に作成しておいたRNA断片マーカー (レーン2) と同一の移動度を示すことから、コムギ胚芽リボソームの28 S r RNAの脱アデニン部は、進化的にその構造が保存されたRNA N-グリコシダーゼの特異的な作用部位 (ネズミ肝28 r RNAの4324番目のアデニンに対応) であることが判明した。

[0025]

RNA is extracted from the reaction mixture of reaction 2 and 4 or 6 hours after, respectively, after performing bottom aniline treatment of the acidity, when 28rRNA was separated, it was observed in the arrow-head section of FIG. 1 by the gel electrophoresis that a new RNA fragment arises (each arrow-head section of lanes 3, 4, and 5).

Generation of a RNA fragment is not seen before a heat retention start (lane 1).

Since this RNA fragment showed the mobility of the same as the RNA fragment marker (lane 2) made separately, it became clear that the de adenine section of 28SrRNA of a wheat embryo ribosome was the specific effect part (it corresponded to the 4324th adenine of rat liver 28rRNA) of the RNA N-glycosidase where that structure was preserved evolutionally.

【0026】

以上の結果は、コムギ胚芽の破碎に伴って、内因性のRNA N-グリコシダーゼが何らかの機作によって活性化したことを

[0026]

The above result is showing that accompanied to crushing of a wheat embryo and the endogenous RNA N-glycosidase was activated by a certain mechanism.

示している。さらに、この結果は、コムギ胚芽無細胞系においては、蛋白質合成反応中にこのRIPの作用によって、リボソームの不活性が生じることを示唆している。

【0027】

次に、このRNA N-グリコシダーゼの蛋白質としての実体がトリチンであるか否かを調べる目的で、家兎にて作製したトリチン抗体を用いて、上記RNA N-グリコシダーゼの中和実験を試みた。上記と同様な蛋白質合成系にトリチン抗体を添加して6時間反応を行い、同様にRNAをゲル電気泳動で分解した。

【0028】

その結果、トリチン抗体の添加によって、RNA断片の生成が著しく抑制されることが確認された（図1、レーン5とレーン6の矢印部のバンドの濃さを比較するとレーン6が著しく薄くなった）。この事実は、コムギ胚芽リボソームの修飾反応（脱アデニン化）が、内因性のRIPであるトリチンによって触媒されたことを示している。さらにこの結果は、生理機能が不明であったコムギ胚芽トリチンが、傷ついた胚芽細胞のリボソームを不活性化し、みずから自殺す

Furthermore, this result suggests that the inactivity of a ribosome arises with this effect of RIP in a protein-synthesis reaction in a wheat embryo cell free system.

[0027]

Next, the neutralization experiment of the above-mentioned RNAN-glycosidase was tried using the tritin antibody produced in the domestic rabbit in order to examine whether the substance as a protein of this RNA N-glycosidase is tritin.

The tritin antibody was added to the protein constructional system similar to the above, the reaction was carried out to it for 6 hours, and RNA was similarly degraded into it by the gel electrophoresis.

[0028]

As a result, it was checked by addition of the tritin antibody that generation of a RNA fragment is suppressed remarkably (lane 6 became remarkably thin when the thickness of the band of the arrow-head section of FIG. 1, lane 5, and lane 6 was compared).

This fact is showing that tritin which is endogenous RIP catalysed the modification reaction (formation of de adenine) of a wheat embryo ribosome.

As for this result, wheat embryo Tori Ching whom the physiology function had further inactivates the ribosome of the germinal cell which got damaged, by killing itself, it is showing working as the so-called factor of the

ることによって、ウイルス感染などを防ぐ、いわゆるプログラム細胞死機構の因子として働いていることを示している。

programmed-cell-death machine mechanism which prevents a virus infection etc.

【0029】

また本実験結果は、細胞破碎によって起因されたトリチンの活性を、同蛋白質に対する抗体を用いることによって有効に中和することが可能なことも示している。しかし、この翻訳反応系へ抗体を添加する方法による中和は完全でないことが分かる（レーン6で若干の特異バンドが生成することで分かる）。そこで、トリチン活性を除去することを目的に、コムギ胚芽抽出液の調製は、以下の2方法を併用した。すなわち、(1) 抽出液は、トリチン抗体存在下に調製する、(2) トリチン抗体を固定化したカラムに抽出液を通し、内蔵性トリチンを補集除去することである。

[0029]

Moreover, this experimental result is also showing that the activity of tritin which originated by cell crushing can be effectively neutralized by using the antibody with respect to this protein.

However, it turns out that the neutralization by the method of adding an antibody to this translation reaction system is not perfect (it understands because a little unique band generates on lane 6).

Then, manufacture of a wheat embryo extract used the following two methods together for the purpose of removing the tritin activity.

That is, (1) extract is prepared in the presence of the tritin antibody, (2) It is through about an extract to the column which immobilized the tritin antibody, it is carrying out collection elimination of endogenous tritin.

【0030】

このようにして得たコムギ胚芽抽出液を用いて、上記と同様に蛋白質合成反応を行い、RNAを分析した結果を図1のレーン7に示した。写真から分かるように、6時間の反応において、特異なRNA断片がほとんど生成しない（レーン7の矢印部分にはほとんど特異バンドが見ら

[0030]

In this way, using the obtained wheat embryo extract, the protein synthesis was reacted in the same manner to the above, and the result of having analyzed RNA was shown on lane 7 of FIG. 1.

It sets for the reaction of 6 hours so that a photograph may show, a unique RNA fragment hardly generates (a unique band is hardly observed by the arrow-head part of lane 7).

れない)。レーン6、7に対応する対照実験を非免疫抗体を用いると(レーン8、9)、レーン5で見られたと同様に、リボソームの顕著な脱アデニン化反応が認められる。

【0031】

【実施例2】トリチン抗体を利用した、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成系の効率化

【0032】

RNA N-グリコシダーゼの作用によって脱アデニン化したリボソームは、mRNA上でフリーズし、ペプチド鎖伸長反応が停止することが知られている。(Furutani, M., et al., Arch. Biochem. Biophys. (1992), 293, 140-146)。そこで、上記実施例1で示した条件下で、DHFR合成を¹⁴C-ロイシンの蛋白質への取り込みから測定した。実験方法は、エリクソン, A.H.らの常法を用いた。その結果を図2に示す。

【0033】

図2に示したように、従来のコムギ胚芽無細胞蛋白質合成系では、鋳型mRNAの添加に依存して翻訳反応が進行するが、2時間後には、反応が完全に停止する(●-●)。同様な反応液に

In the control experiment corresponding to lanes 6 and 7, if a nonimmune antibody is used (lanes 8 and 9), the remarkable de adenine-ized reaction of a ribosome will be similarly observed to have seen on lane 5.

[0031]

[Example 2]

Increase in efficiency using the tritin antibody of a wheat embryo non-cellular-proteins constructional system

[0032]

The ribosome formed into de adenine with an effect of a RNA N-glycosidase is frozen on mRNA, it is known that a peptide-chain elongation reaction will stop.

(Furutani, M., et al., Arch. Biochem. Biophys. (1992), 293, 140-14). Then, the DHFR synthesis was measured from the capture to the protein of a ¹⁴C- leucine on the conditions shown in above-mentioned Example 1.

For the experiment method, a Ericsson, A.H. et al., the conventional method was used.

The result is shown in FIG. 2.

[0033]

As shown in FIG. 2, in the conventional wheat embryo non-cellular-proteins constructional system, a translation reaction advances depending on addition of casting mould mRNA. However, 2 hours after, a reaction stops completely (BLACK-CIRCLE-BLACK-CIRCLE).

トリチン抗体を添加すると、翻訳反応が約3時間まではほぼ直線的に進行し、さらにその後も反応が持続することが分かる(□-□)。さらに、内源性トリチンを除去し、反応時にトリチン抗体を添加した反応系では、翻訳反応が5時間以上にわたって、ほぼ直線的に進行することが明らかにになった(△-△)。これと同様な実験を非トリチン抗体存在下で行っても、その効果は全く認められない(■-■)。なお、鋳型mRNAの添加を行わない場合は、蛋白質合成は行われない(○-○)。

【0034】

これらの結果は、抗トリチン抗体がコムギ胚芽無細胞蛋白質合成系における蛋白質合成の効率を著しく上昇させることを示している。図2の¹⁴C-ロイシンの取り込み放射活性から、DHFRの反応系1ml当たりの合成量を計算すると、従来の無細胞系では最大限で約40μgであるのに対し、トリチン抗体を利用して、内源性トリチンを除去・中和した系では約105μgであった。この収量は、スピリンらの開発した連続式無細胞蛋白質合成システムを利用する蛋白質合成量[反応液1ml,

If the tritin antibody is added to a similar reaction mixture, a translation reaction will advance almost linearly till about 3 hours, it turns out that a reaction further continues also after that ((SQUARE)-(SQUARE)).

Furthermore, endogenous tritin is removed, in the reaction system which added the tritin antibody at the time of a reaction, it became clear that a translation reaction advances almost linearly over 5 hours or more (TRIANGLE-TRIANGLE).

Even if it conducts the similar experiment as this in the non-tritin antibody presence, the effect does not private seal exist (BLACK-SQUARE-BLACK-SQUARE).

Furthermore, a protein synthesis is not performed when not adding casting mould mRNA (CIRCLE-CIRCLE).

[0034]

These results are showing that an anti- tritin antibody raises remarkably the efficiency of the protein synthesis in a wheat embryo non-cellular-proteins constructional system.

From the capture radioactivity of the ¹⁴C-leucine of FIG. 2, calculation of the synthetic amount per 1 ml of reaction systems of DHFR utilizes the tritin antibody to being about 40 microgram(s) at its maximum by the conventional cell free system, in the group which removed * neutralized immanent tritin, they were about 105 microgram(s).

This yield, the protein-synthesis amount using the continuous system non-cellular-proteins synthesis system which Spirins developed, they were 1 ml of reaction mixtures, and one which is

反応時間 20 時間当たり 97 μ equal to 97 microgram (Endo, Y., et al.,
 g] (Endo,Y., et J.Biotechnology (1992), 25,221-230) per
 al.,J.Biotechnology(1992),25,2 reaction-time 20 times.
 21-230) に匹敵するものであつ
 た。

【 0 0 3 5 】

[実施例 3]

翻訳産物の同定

[0035]

[Example 3]

The identification of a translation production

【 0 0 3 6 】

図 2 では、 ^{14}C -ロイシンの蛋白質への取り込みを測定したが、実際に目的とする完成された DHFR が、合成されていることを確認する目的で、6 時間の反応後、反応液の一部 (2.5 μl) を採り、蛋白質 SDS-ゲル電気泳動によって分離し、蛋白質のバンドをクマシーブリリアントブルーを用いて染色した (図 3)。

[0036]

The capture to the protein of a ^{14}C - leucine was measured in FIG. 2.

However, the perfected target DHFR takes one part (2.5 microliter) of a reaction mixture after the reaction of 6 hours, and actually separates by a protein SDS-gel electrophoresis in order to check being compounded, the proteinic band was colored using the coomassie brilliant blue (FIG. 3).

【 0 0 3 7 】

レーン 1 は DHFR mRNA 非存在下、レーン 2 はその存在下で蛋白質合成を行ったものである。レーン 3 はトリチン抗体を反応系に添加したもの、レーン 4 はトリチンをトリチン抗体を利用して、除去・中和した反応液を分析したものである。レーン 4 の矢印部に DHFR と同一の移動度を示す蛋白質バンドが明確に認められる。また、対応するバンドがレーン 1 には確認

[0037]

As for lane 1, lane 2 performed the protein synthesis in the presence by the DHFRmRNA absence.

One and lane 4 to which lane 3 added the tritin antibody to the reaction system utilize the tritin antibody for tritin, the reaction mixture removed * neutralized was analyzed.

The protein band which shows the mobility of the same as DHFR is clearly observed in the arrow-head section of lane 4.

Moreover, since a corresponding band could not check on lane 1, it was concluded that this

できないことから、これがDHFR mRNAの翻訳産物であると結論した。従来のコムギ胚芽無細胞蛋白質合成系では、生成量が少ないことからDHFRは明瞭なバンドとしては観察されない。

【0038】

さらにレーン4とレーン3のデンストメーターを用いたDHFRバンドのスキニングの結果から、既に発明者らは、従来の無細胞系を用いてDHFR合成を試み、この翻訳産物が酵素活性を保持していることを見い出している (Endo, Y., et al., J. Biotechnology (1992), 25, 21-230) ので、本実験で合成されたDHFRも酵素活性を有する蛋白質としての構造を保持しているものと考えられる。

【0039】**【発明の効果】**

本発明は従来1～2時間程度で反応の進行が止まってしまった無細胞蛋白質合成系の寿命を3～5時間以上に延ばすばかりか、反応効率も上昇させるという優れた効果を有し、特に生成蛋白量が従来の系の2.5倍以上にも達することにより、蛋白質製造コストの低減に大きく寄与する効果が認められる。また

was the translation production of DHFR mRNA. In the conventional wheat embryo non-cellular-proteins constructional system, since there are few generation amounts, DHFR is not observed as a clear band.

[0038]

From the result of a scanning of the DHFR band using the densitometer of lane 4 and lane 3, already further inventors

That try a DHFR synthesis using the conventional cell free system, and this translation production maintains the enzyme activity by that which is found out (Endo, Y., et al., J. Biotechnology (1992), 25, 221-230)

It is thought that the structure as a protein where DHFR compounded in this experiment also has an enzyme activity is maintained.

[0039]**[ADVANTAGE of the Invention]**

This invention not only prolongs the life span of the non-cellular-proteins constructional system to which advance of a reaction has stopped in about 1 to 2 hours conventionally in 3 to 5 hours or more, but has the outstanding effect of also raising reaction efficiency, when in particular a generation protein amount reaches to 2.5 or more times of the conventional group, the effect which contributes to reduction of a protein manufacturing cost greatly is observed.

スピリンらの開発した連続式蛋白質合成系と組み合わせることにより、さらなる効率化が期待できる。

Moreover, by combining with the continuous system protein constructional system which Spirins developed, the further increase in efficiency is expectable.

【図面の簡単な説明】

[BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS]

【図 1】

実施例 1 の実験結果を示す電気泳動図

[FIG. 1]

Electropherogram which shows the experimental result of Example 1

【図 2】

実施例 2 の実験結果を示すグラフ

[FIG. 2]

The graph which shows the experimental result of Example 2

【図 3】

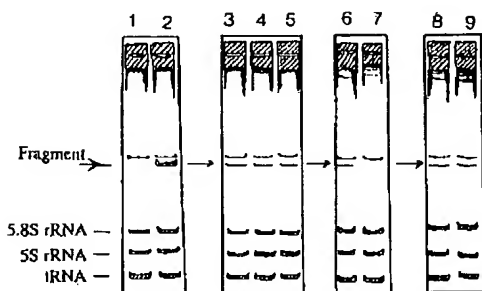
実施例 3 の実験結果を示す電気泳動図

[FIG. 3]

Electropherogram which shows the experimental result of Example 3

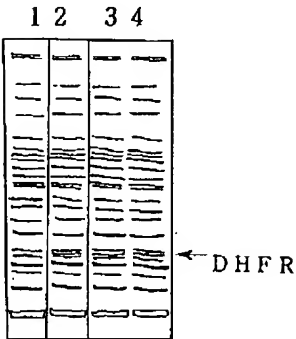
【図 1】

[FIG. 1]



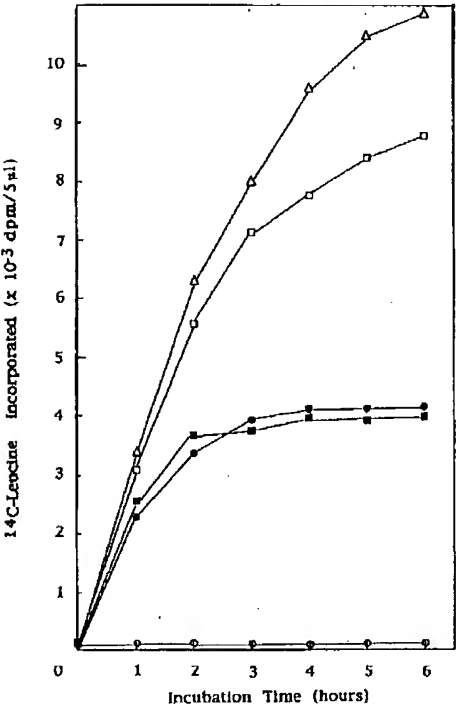
【図 3】

[FIG. 3]



【図 2】

[FIG. 2]





DERWENT TERMS AND CONDITIONS

Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page: ["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)
["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)